INTERÉS CLÍNICO

El antígeno específico de próstata (PSA), inicialmente caracterizado por Wang y colaboradores (1), es una glicoproteína de 34 KDa que funciona como una proteasa en el suero, más comúnmente localizado en el líquido seminal. El PSA es producido por el epitelio prostático y las células neoplásicas del tejido prostático humano, y aunque se ha localizado también en otros tejidos, se considera que su presencia en el suero en concentraciones superiores a 4 µg/L (4 ng/mL) se correlaciona con un riesgo elevado de padecer cáncer de próstata (2). Estudios realizados han revelado que el PSA presente en el suero se puede encontrar en su forma simple (libre) y unida al complejo α_1-antiquimiotripsina (ACT). Es por ello que la determinación de PSA en suero resulta de gran interés:

- Como marcador tumoral: El PSA es considerado como un marcador tumoral asociado a enfermedades malignas de la próstata, por lo cual se ha utilizado no sólo para el diagnóstico, sino también para la vigilancia y seguimiento del tratamiento en pacientes con tumores secretores de PSA (3).

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA PSA es un análisis inmunoenzimático heterogéneo tipo "sandwich" que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina. El ensayo determina PSA Libre y Total sobre una base equimolar. Se utiliza como fase sólida, tiras de ultramicroELISA (10 µL por pocillo) revestidas con anticuerpos monoclonales anti PSA con epitopo lineal de alta afinidad dirigidos contra el PSA. Las muestras se incuban en los pocillos de la tira y si éstas contienen PSA, la misma se fija a los anticuerpos del recubrimiento. La realización de un lavado posterior elimina los componentes de la muestra no fijados, se añaden anticuerpos monoclonales biotinilados específicos al PSA Total o al PSA Libre, que se unirán al complejo formado sobre la fase sólida. Una vez eliminados los anticuerpos biotinilados en exceso, se añade el conjugado Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina (F.A.) y luego de un paso de incubación y lavado, se adiciona el sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato), que será hidrolizado. La intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de PSA Total o Libre en la muestra.

El **UMELISA PSA** es un ensayo diseñado para la determinación de antígeno específico de próstata (total y libre) en muestras de suero humano, para evaluar pacientes con síntomas de mayor o menor riesgo de presentar un adenocarcinoma prostático y la población de riesgo (hombres mayores de 40 años).

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO. Código UM 2036 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero Estándar (a-f)*	7 x Liofilizado
R3: Suero Control	1 x Liofilizado
R4: Anticuerpos Biotinilados 1	1 x 7,5 mL
R5: Anticuerpos Biotinilados 2	1 x 2 mL
R6: Conjugado	1 x 7,5 mL
R7: Sustrato	1 x 2 mL
R8: Tampón Sustrato	1 x 18 mL

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.
*Calibrado frente al patrón de referencia internacional "IRP 96/670" de la O.M.S.
Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.
Los Sueros Estándares y el Suero Control fueron negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, HBsAg, Anti-VHC y Sífilis, no obstante deben ser manipulados como materiales potencialmente infecciosos.

Preparación de las soluciones de trabajo:
Para la determinación cuantitativa de PSA Total:
R1: Para 4 tiras de reacción, diluya 2 mL de la solución R1 hasta un volumen de 50 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.
R2 (a, b, c, d, e y f): Reconstituya cada frasco con 0,5 mL de la solución de trabajo R1. Permita su completa disolución y mezcle.
R3: Reconstituya con 0,5 mL de la solución de trabajo R1. Permita su completa disolución y mezcle.
R4: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.
R6: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.
R7: Diluya 1:10 con R8. Cantidad necesaria para 4 tiras de reacción: 2 mL (0,2 mL de R7 + 1,8 mL de R8). Prepare inmediatamente antes de usar.
Para la determinación cuantitativa de PSA Libre:
R1, R3 y R7: De igual forma que lo descrito para la cuantificación de PSA total.
R2 (a, a.1, b, c, d y f): Reconstituya cada frasco con 0,5 mL de la solución de trabajo R1. Permita su completa disolución y mezcle.
R5: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.
R6: Diluya 1:2 con R1 inmediatamente antes de usar y solamente lo necesario para el ensayo. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL (0,1 mL de R6 + 0,1 mL de R1).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 °C. En estas condiciones serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.
Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.
Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses, de 2 a 8 °C, en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Incubadora a 37 ± 1 °C.
- Papel absorbente.

PRECAUCIONES

- Manipule las muestras, los Sueros Estándares y el Suero Control, como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.
- Las muestras de suero a utilizar deben ser preferentemente frescas, sin precipitados y debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las mismas.
- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén a temperatura ambiente y los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez preparados según las especificaciones, se encuentren completamente disueltos.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora, para evitar que se condense humedad en su superficie.
- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Utilice puntas limpias o nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones y muestras.
- Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las muestras y reactivos una vez aplicados, deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su

adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
- Si utiliza la multipipeta ERIZO para transferir los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras, debe lavar profusamente sus puntas para evitar la contaminación, al menos un lavado de cinco ciclos con solución de trabajo R1 y un lavado de cinco ciclos con agua destilada. Deseche la solución y el agua destilada después de cada lavado.
- Si su laboratorio ejecuta numerosos ensayos donde se usen diferentes tipos de muestras (suero, plasma, sangre seca), verifique que las cabezas de Dispensación y Aspiración del Lavador utilizado hallan sido previamente desinfectadas y el equipo se encuentre adecuadamente cebado (ver Manual de Usuario).
- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos
- Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos del UMELISA PSA de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.-Preparación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras de suero.

Sueros Estándares y Suero Control:
Los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez reconstituidos, quedan listos para su uso. La concentración se corresponde con la especificada en la etiqueta de los frascos. Para determinación de PSA Total: R2a, R2b, R2c, R2d, R2e y R2f y para la determinación de PSA Libre: R2a, R2a.1, R2b, R2c, R2d y R2f.

Muestras:
Las muestras se diluyen 1:4 con la solución de trabajo R1 al menos 15 minutos antes de transferirlos a las tiras de reacción.

2.-Adición de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras a las tiras de reacción.
Añada 10 µL de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras de suero.

a) Para la cuantificación de PSA Total en muestras de suero:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R2a	R2e	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	R2a	R2e	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	R2b	R2f	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	R2b	R2f	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	R2c	R3	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	R2c	R3	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	R2d	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	R2d	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

b) Para la cuantificación de PSA Libre en muestras de suero:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R2a	R2d	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	R2a	R2d	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	R2a.1	R2f	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	R2a.1	R2f	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	R2b	R3	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	R2b	R3	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	R2c	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	R2c	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Los Sueros Estándares (R2a-R2f) y el Suero Control (R3) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA PSA para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.-Incubación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.-Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción 4 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo

30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.-Adición de los Anticuerpos Biotinilados.

Con una punta nueva extraiga del frasco de Anticuerpos Biotinilados el volumen necesario a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 μL de Anticuerpos Biotinilados en cada pocillo de la tira reacción según el ensayo que corresponda (PSA Total o PSA Libre).

6.-Incubación de los Anticuerpos Biotinilados.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esta temperatura.

7.-Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.-Adición del Conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado el volumen necesario a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y deposítelo en un recipiente limpio.

Añada 10 μL del conjugado listo para el uso en cada pocillo de la tira reacción en el caso de PSA total. Para PSA libre, diluya 1:2 con solución de trabajo R1 inmediatamente antes de usar y solamente lo necesario para el ensayo.

9.-Incubación del Conjugado.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esta temperatura.

10.-Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

11.-Adición del Sustrato.

Coloque 10 μL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo. Si utiliza lectores que necesitan posiciones en la tira de reacción para el ajuste de 0 y 100, debe exceptuar las posiciones A1 y B1.

12.-Incubación del Sustrato.

Incube en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25 °C). Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 100 a 160 unidades para el Suero Estándar R2f. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura, puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.

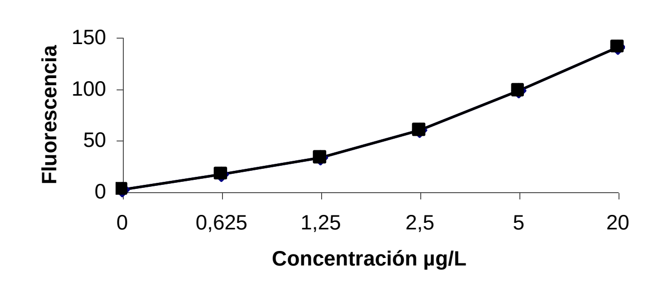
13.-Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación, utilizando un lector de la serie SUMA.

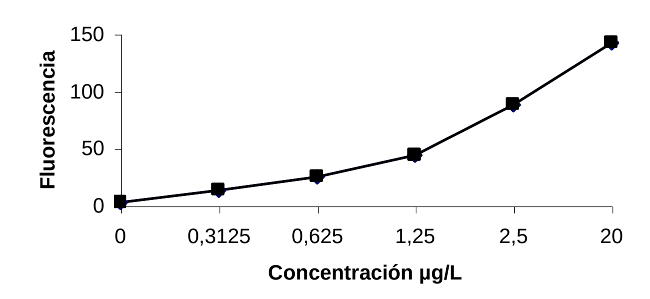
PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Los valores de fluorescencia de las muestras de suero de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra la concentración de PSA (Total o Libre) correspondiente a la Curva Estándar, obteniéndose los resultados en µg/L (ng/mL). Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.

PSA Total



PSA Libre



La validación, interpretación e impresión de los resultados, son realizados automáticamente por el programa UMELISA PSA. A las muestras con valores de concentración de PSA Total de 3,7 a 10 µg/L (3,7 a 10 ng/mL), se les determina PSA Libre y se calcula la relación porcentual (PSA Libre/ PSA Total).

CONTROL DE LA CALIDAD

I. La Curva Estándar debe cumplir la siguiente condición:
La media de los dos valores de fluorescencia para cada Suero Estándar (R2a-R2f) deben proporcionar un incremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.
II. El valor de concentración calculado para el Suero Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.
III. Si las muestras son analizadas por duplicado deben cumplir la siguiente condición:
La diferencia de los valores de fluorescencia de los duplicados de una muestra debe ser menor al 10 % con respecto a su valor medio.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.
El resultado de la concentración de PSA total y PSA libre en suero se expresa en µg/L (ng/mL). Si el resultado de una muestra no se encuentra dentro de los límites de la Curva Estándar, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra apropiadamente con la solución de trabajo R1.
Se consideran normales las muestras con concentraciones de PSA total menores que 3,7 µg/L (3,7 ng/mL), dudosas con concentraciones de 3,7 a 10 µg/L (3,7 a 10 ng/mL) y positivas si las concentraciones son mayores que 10 µg/L (10 ng/mL).
A las muestras dudosas se les determina PSA libre y se establece la relación porcentual (PSA libre/ PSA total) x 100. EL resultado se expresa en porcentaje, si los valores son iguales o menores que el 25 % son considerados de riesgo y si son mayores que el 25 % son considerados normales.

CARACTERÍSTICAS ESPECIFICAS DEL ENSAYO

1. PRECISIÓN.
Se evaluaron tres muestras con concentraciones conocidas de PSA en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

Precisión del UMELISA PSA (Determinación de PSA Total)

(µg/L)	Intraensayo (n=10)		Interensayo (n=20)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
1	0,09	7,88	0,15	8,75
4	0,28	6,23	0,32	6,70
16	0,98	6,17	1,00	6,80

DE: Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación

Precisión del UMELISA PSA (Determinación de PSA Libre)

(µg/L)	Intraensayo (n=10)		Interensayo (n=20)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
0,5	0,09	6,61	0,12	8,80
4	0,16	5,01	0,22	6,70
16	0,88	5,67	1,15	7,80

DE: Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación

2. EXACTITUD.

Se añadieron cantidades conocidas de PSA a tres sueros normales y se determinó el porcentaje de recuperación al comparar los resultados obtenidos con los valores esperados para cada muestra, lo cual promedió un 96,2 ± 4 % para la determinación de PSA Total y un 92,8 ± 5,8 % para la determinación de PSA Libre. Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

Recuperación del UMELISA PSA (Determinación de PSA Total)

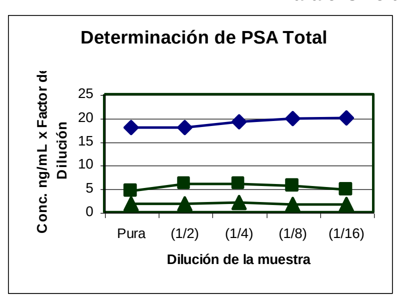
Muestras	Valor Esperado (µg/L)	Valor Obtenido (µg/L)	Recuperación (%)
1	4,00	3,97	99,25
2	6,25	6,10	97,60
3	16,00	14,67	91,68

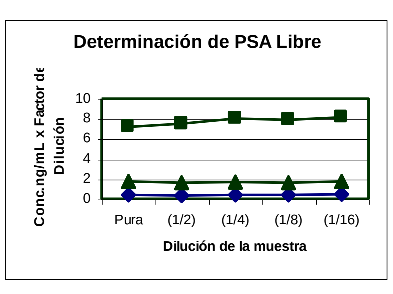
Recuperación del UMELISA PSA (Determinación de PSA Libre)

Muestras	Valor Esperado (µg/L)	Valor Obtenido (µg/L)	Recuperación (%)
1	0,40	0,39	98,00
2	1,50	1,30	86,60
3	8,00	7,50	93,75

Se realizaron diluciones seriadas a tres muestras de pacientes con diferentes niveles de PSA, las curvas resultantes son paralelas a la Curva Estándar. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fueron ± 9,07 % para PSA Total y de ± 6,03 % para PSA Libre de la concentración original de la muestra pura.

Paralelismo del UMELISA PSA





Leyenda:

▲**:** Muestra 1 ◆**:** Muestra 2 ■**:** Muestra 3

3. DETECTABILIDAD.

La detectabilidad determinada para PSA Total es de 0,02058 µg/L (0,02058 ng/mL) y para PSA Libre de 0,0529 µg/L (0,0529 ng/mL). Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Suero Estándar R2a + 2 D.E., utilizando como referencia el patrón internacional IRP 96/670 de la OMS.

4. ESPECIFICIDAD.

El anticuerpo monoclonal anti PSA CB PSA 4 es altamente específico para PSA, por lo que no se ha evidenciado interferencia en el ensayo con otras proteínas séricas.

Componente	Cantidades añadidas	% de reactividad cruzada
AFP	10,000 ng/mL	ND
Ferritina	10,000 ng/mL	ND
HCG	100,000 mUI/mL	ND
PAP	1,000 ng/mL	ND
Prolactina	200 ng/mL	ND

ND: no detectable

BIBLIOGRAFÍA

1.-John Bernard Henry. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª Edición, Salvat 1993; 293-315.
2.-Stewart sell. Cancer markers of the 1990s. Comparison of the new generation of markers defined by monoclonal antibodies and oncogene probes to prototypic markers. Clinics in Laboratory Medicine, March 1990 (10,1); 1-37.
3.-Rivera Hidalgo Pablo. Valores de referencia, Laboratorio de Hormonas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.
4.-Osterling Joseph E. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. The Journal of Urology, May 1991; 145:907-23.
5.-Anders Christensson et al. Serum prostate specific antigen complexed to a1- Antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. The Journal of Urology, Apr 1992; 147:100-105.
6.-Wolff JM et al. Differentiation of bening prostatic hyperplasia and prostate cancer employing prostatic-specific antigen density. Eur Urol 1994; 25: 295-98.
7.-Hans Liljia et al. Prostate specific antigen predominantly forms a complex with alpha1 – antichymotrypsin in blood. Cancer 1992; 70: 230-34.
8.-Per Anders Abrahamsson et al. Free and complexed forms of prostate- specific antigen in serum. Tumor Marker Update 1994; 6: 1-4.
9.-Ulf-Hakan Stenman et al. A complex between prostate-specific antigen and a1-antichymotrypsin is the major form of prostate- specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. J cancer Research January 1991; 51: 222-26.
10.-Curtis Mettlin et al. Relative sensitivity and specificity of serum prostate specific antigen (PSA) level compared with age-referenced PSA, PSA density and PSA change. Cancer 1994; 74: 1615-20.
11.-Tsuneo Kobayashi et al. Prospective investigation of tumor markers and risk assessment in early cancer screening. Cancer 1991; 73: 1946-53.

Marzo 4, 2003.

UMELISA PSA

Código UM 2036

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, Cuba. Teléfono: 208-2929, Fax (537) 208-6514.